

B2

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-026991

(43)Date of publication of application : 30.01.1996

(51)Int.Cl.

A61K 31/35
A61K 35/78
// C07D311/62

(21)Application number : 06-185228

(71)Applicant : KUREHA CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 14.07.1994

(72)Inventor : SHOBU YOICHI
SHIRAGAMI TOSHIMI
MORINO MASAYOSHI
YOSHIKUMI CHIKAO

(54) SENSITIZER FOR MEDICINE SENSITIVITY OF ANTIBIOTIC-RESISTANT MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a sensitizer for the medicine sensitivity of a microorganism acquiring the resistance to an antibiotic substance, containing a polyphenol compound or a green tea extract as an active ingredient and usable especially in the field of chemotherapy of infectious diseases.

CONSTITUTION: This sensitizer for the medicine sensitivity of a microorganism resistant to an antibiotic substance contains 0.01-99wt.% 10-50C polyphenol compound having 5-20 OH groups (e.g. epigallocatechin gallate) or an extract of green tea separated with water or an organic solvent (e.g. methyl alcohol) as an active ingredient. The polyphenol compound is excellent in suppressing actions on the manifestation or induction of the resistance of the microorganism to the antibiotic substance and has effects on sensitization of antibiotic sensitivity of the microorganism acquiring the resistance thereto by using thereof with the antibiotic substance. Escherichia coli, enterococci, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, etc., are cited as the resistant microorganism and penicillin G, streptomycin, kanamycin, etc., are cited as the antibiotic substance. The active ingredient is prepared as a pharmaceutical preparation according to a conventional method and orally or parenterally administered in 1mg to 10g daily dose 1-4 times.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.03.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2915802

[Date of registration] 16.04.1999

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right] 16.04.2002

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-26991

(43) 公開日 平成8年(1996)1月30日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/35				
35/78		C 8217-4C		
// C 0 7 D 311/62				

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平6-185228	(71) 出願人	000001100 呉羽化学工業株式会社 東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号
(22) 出願日	平成6年(1994)7月14日	(72) 発明者	清輔 洋一 東京都新宿区百人町3-26-1-303
		(72) 発明者	白神 俊美 東京都小平市大沼町1-180-1-306
		(72) 発明者	森野 眞嘉 東京都練馬区光が丘3-7-2-207
		(72) 発明者	吉汲 親雄 東京都国立市東2-19-46
		(74) 代理人	弁理士 森田 憲一

(54) 【発明の名称】 抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤

(57) 【要約】

【目的】 抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤を提供する。

【構成】 炭素数が10～50で、水酸基の数が5～20のポリフェノール化合物、あるいは、茶の水又は有機溶媒抽出物を含む。

【効果】 本発明の有効成分は、抗生物質に対して耐性を獲得した微生物の該抗生物質に対する薬剤感受性を増感させると共に該微生物に対する上記抗生物質の効力およびその効能範囲を拡大させる。また、古来より飲用されてきた茶の成分であり、入手が容易で安全性も高い。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 炭素数が10～50で、水酸基の数が5～20のポリフェノール化合物を含むことを特徴とする、抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤。

【請求項2】 ポリフェノール化合物がエピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキン及びこれらの異性体、遊離型テアフラビン、テアフラビンモノガレートA、テアフラビンモノガレートB並びにテアフラビンジガレートからなる群から選ばれた化合物の少なくとも1種である、請求項1記載の薬剤感受性増感剤。

【請求項3】 茶の水又は有機溶媒抽出物を有効成分とし、薬剤上許容される担体を含むことを特徴とする、抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ポリフェノール化合物（特に茶ポリフェノール）又は茶抽出物を有効成分として含有する、抗生物質に対して耐性を獲得した微生物の薬剤感受性増感剤に関する。本発明の抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤は、特に感染症の化学療法分野で用いることができる。

【0002】

【従来の技術】化学療法、特に抗生物質の普及により、結核、赤痢などをはじめとする細菌感染症の激減は目を見張るものがあり、その公衆衛生への貢献ははかりしれない。しかしながら、抗生物質の使用の増加にともない、1950年代後半から、抗生物質の効かない、いわゆる抗生物質耐性菌が出現しはじめ、近年急速に増加しつつある。最近では、特に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRS A）に代表される抗生物質耐性菌が、院内感染菌として蔓延している。結核菌、赤痢菌、ブドウ球菌など重要な病原菌においては多くの種類の薬剤に耐性を示す、いわゆる多剤耐性菌が多い。これらの耐性菌で、その病原性が強い細菌が起炎菌である場合は、最も治療困難な難治性重症感染症となることが予想され、感染症の化学療法を遂行する上で大きな問題となっている。このような薬剤耐性菌増加の理由から、一般に抗生物質製剤のライフサイクルは短く、医薬品メーカーは莫大な費用をかけて、次々に新規抗生物質を市場に供給しなければならず、その損失は社会的にみて無視できない巨額に達する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、抗生物質に対して耐性を獲得した微生物の薬剤感受性を顕著に向上することができ、かつ長期の連用に於て安全性の高い物質について探索した結果、意外にも、一群のポリフェノール化合物には、微生物の抗生物質耐性の発現や誘

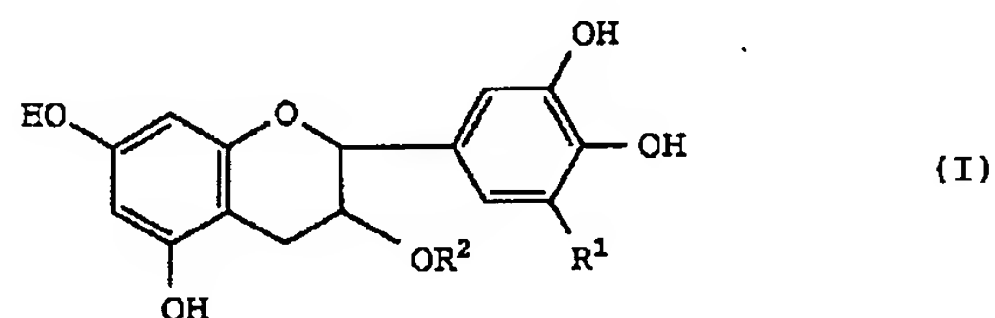
導を抑える優れた作用があることを見出した。従って、本発明の目的は、抗生物質に対して耐性を獲得した微生物の該抗生物質に対する薬剤感受性を増感させると共に該微生物に対する上記抗生物質の効力およびその効能範囲を拡大しうる増感剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、炭素数が10～50で、水酸基の数が5～20のポリフェノール化合物を含むことを特徴とする、抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤に関する。また、本発明は、茶の水又は有機溶媒抽出物を含むことを特徴とする、抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤にも関する。

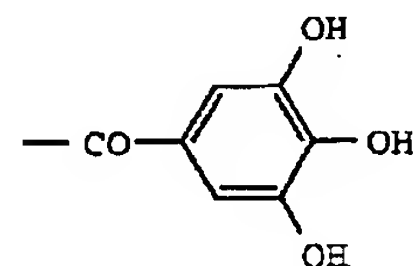
【0005】以下、本発明を詳細に説明する。本発明による抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤において有効成分として用いるポリフェノール化合物は、炭素数が10～50で、水酸基の数が5～20の化合物である。好ましいポリフェノール化合物は、ジ-又はトリ-ヒドロキシクロマン環を有し、例えば、一般式（I）：

【化1】



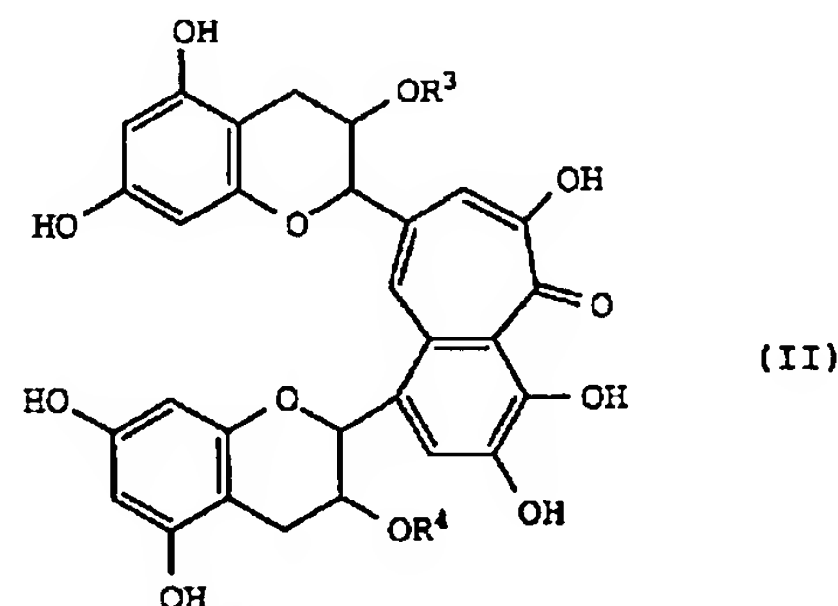
（式中、R¹ は水素原子又はヒドロキシル基であり、R² は水素原子又は式

【化2】



で表される3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である）で表される化合物及びその異性体を挙げることができる。更に、一般式（II）：

【化3】

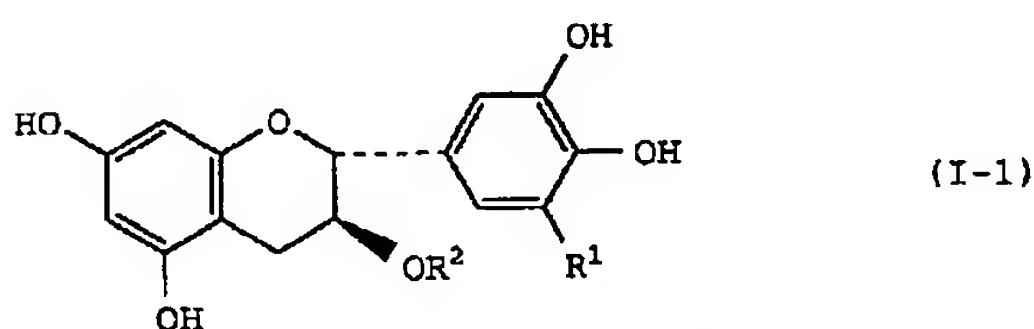


（式中、R³ 及びR⁴ は、同じか又は異なり、水素原子又は3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である）で表される化合物及びその異性体も好ましい化

合物として挙げる事ができる。なお、本発明では、純粋な立体異性体又はそれらの混合物を用いることができる。

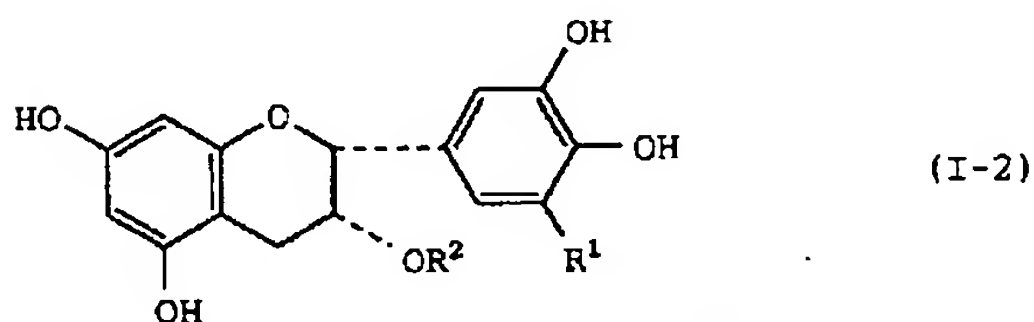
【0006】前記一般式(I)で表されるポリフェノール化合物の内、特に好ましい化合物として、一般式(I-1)：

【化4】



(式中、 R^1 及び R^2 は前記と同じ意味である)で表される化合物、又は一般式(I-2)：

【化5】



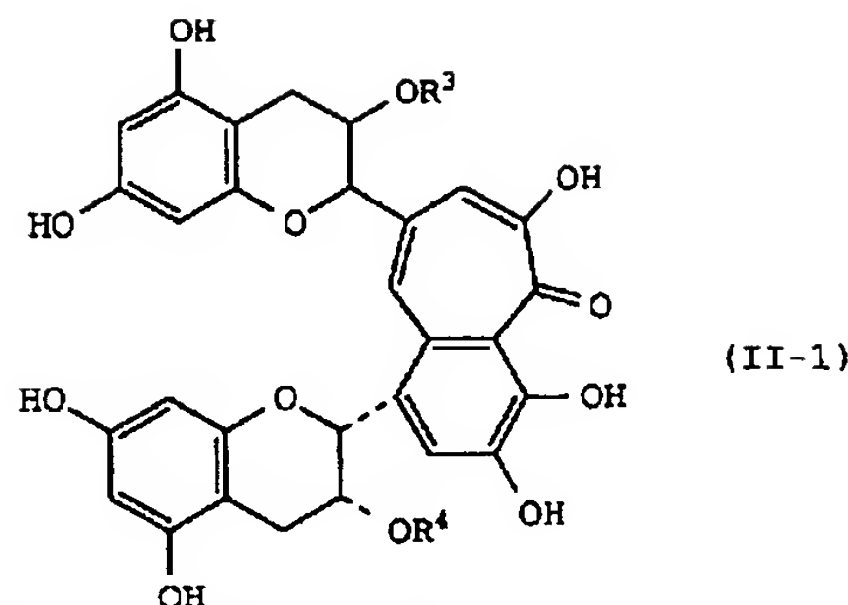
(式中、 R^1 及び R^2 は前記と同じ意味である)で表される化合物を挙げる事ができる。

【0007】前記一般式(I-1)において、 R^1 及び R^2 が水素原子である化合物は、(+)カテキンであり； R^1 がヒドロキシル基であり、 R^2 が水素原子である化合物は、(+)ガロカテキンであり； R^1 が水素原子であり、 R^2 が3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である化合物は、(+)カテキンガレートであり； R^1 がヒドロキシル基であり、 R^2 が3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である化合物は、(+)ガロカテキンガレートである。

【0008】また、前記一般式(I-2)において、 R^1 及び R^2 が水素原子である化合物は、(-)エピカテキンであり； R^1 がヒドロキシル基であり、 R^2 が水素原子である化合物は、(-)エピガロカテキンであり； R^1 が水素原子であり、 R^2 が3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である化合物は、(-)エピカテキンガレートであり； R^1 がヒドロキシル基であり、 R^2 が3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である化合物は、(-)エピガロカテキンガレートである。

【0009】また、前記一般式(II)で表されるポリフェノール化合物の内、特に好ましい化合物として、一般式(II-1)：

【化6】



(式中、 R^3 及び R^4 は前記と同じ意味である)で表される化合物を挙げる事ができる。

【0010】前記一般式(II-1)において、 R^3 及び R^4 が水素原子である化合物は、遊離型テアフラビンであり； R^3 が3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基であり、 R^4 が水素原子である化合物は、テアフラビンモノガレートAであり； R^3 が水素原子であり、 R^4 が3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である化合物は、テアフラビンモノガレートBであり； R^3 及び R^4 が3, 4, 5-トリヒドロキシフェニルカルボニル基である化合物は、テアフラビンジガレートである。

【0011】前記一般式(I)及び一般式(II)で表される化合物は、市販品を用いるか、あるいは合成するか又は天然物から抽出して精製することによって入手することができる。前記一般式(I)及び一般式(II)で表される化合物は、主に茶ポリフェノール類として知られており、天然物から抽出して精製する場合には、限定するものではないが、茶から抽出することが好ましい。

【0012】本発明による抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤は、茶の水抽出物又は有機溶媒抽出物を有効成分として含んでなることもできる。本明細書において「茶」とは、茶(*Cammellia sinensis*, (L) O. Kuntze)の全草若しくはその一部分、例えば葉、木部、根、実等の生若しくは乾燥物のそのまま若しくは部分発酵物又は完全発酵物を意味し、それらの部分を単独であるいは任意に組み合わせて使用することができる。抽出原料として茶葉を用いる場合、各種形態のものがあ、たとえば茶生葉から仕上げ茶(乾燥茶)まで、通常の製茶工程のいずれの段階のものでもよく、かつ発酵の程度に関係なく、紅茶などの発酵茶、ウーロン茶などの半発酵茶、緑茶などの不発酵茶のいずれをも使用することができる。

【0013】本発明による抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤の有効成分である茶抽出物は、前記の茶ポリフェノール類を含有していればよく、従って、茶の粗抽出物であることができる。この茶粗抽出物を得るためには、茶を温水(好ましくは熱湯)によって抽出するか、又は有機溶媒を用いて抽出することができる。有機溶媒としては、メチルアルコール、エチルアルコール、n-

プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール等の低級アルコール、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル等の低級エステル、アセトン、メチルイソブチルケトン、等を用いることができ、これらの有機溶媒を単独又は適宜組み合わせ、更には無水又は好ましくは含水状態で用いることができる。

【0014】水抽出及び有機溶媒抽出の方法としては、通常の生薬抽出に用いられる方法を用いることができ、例えば（乾燥）茶葉1重量部に対し水又は有機溶媒5～20重量部を用いて攪拌しながらその沸点以下の温度で加熱還流することが望ましい。抽出工程は、通常は5分～7日間、好ましくは10分～24時間実施し、必要に応じて攪拌等の補助的手段を加えることにより抽出時間を短縮することができる。水または有機溶媒抽出液は、濾過あるいは遠心分離等の適当な方法により不溶物と分離することができる。常法による熱水抽出物や有機溶媒抽出物の他、これら抽出液を各種有機溶媒や吸着剤等により更に処理した生成物も、本発明の茶抽出物に含まれる。これら抽出物は、必要により濃縮や乾燥して粉末化したり、さらには冷水より結晶化して精製することができる。こうして得られた茶抽出物は、茶（特に茶葉）に含まれるポリフェノール化合物、すなわち、茶ポリフェノール類、例えば、茶カテキン類（カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、ガロカテキンガレート）や茶テアフラビン類（遊離型テアフラビン、テアフラビンモノガレートA、テアフラビンモノガレートB、テアフラビンジガレート）を混合物として含み、同時に原料茶に由来する不純物を含んでいる。

【0015】本発明で活性成分として用いるポリフェノール化合物は、抗生物質と併用することにより、前記抗生物質に対する耐性を獲得した微生物に対し、前記抗生物質感受性を増感させる効果を有する。ポリフェノール化合物がそれとの併用により上記増感効果を示す抗生物質は、カビ、細菌又は放線菌により産生されるものであって特に限定されるものではないが、例えば、ペニシリンG（Penicillin G）、ストレプトマイシン（Streptomycin）、カナマイシン（Kanamycin）、クロラムフェニコール（Chloramphenicol）、テトラサイクリン（Tetracycline）、エリスロマイシン（Erythromycin）、アミノベンジルペニシリン（Aminobenzylpenicillin）、セファロリジン（Cefaloridine）、コリスチン（Colistin）、セファロスפורイン（Cephalosporin）、ゲンタマイシン（Gentamycin）、ネオマイシン（Neomycin）、バンコマイシン（Vancomycin）、リファンピシン（Rifampicin）、等との併用が特に有効である。

【0016】ポリフェノール化合物が上述した薬剤増感効果を示す耐性微生物としては、例えば、大腸菌、腸球菌、黄色ブドウ球菌、アエロゲネス菌、ゲルトネル菌、赤痢菌、肺炎桿菌、ミラビリス変形菌、尋常変形菌、緑膿菌、結核菌、溶血性連鎖球菌、肺炎球菌、霊菌、インフルエンザ菌、ウェルシュ菌、セレウス菌、チフス菌などが挙げられる。

【0017】ポリフェノール化合物の薬剤耐性微生物の増感作用については、次の方法により確認した。

（1）耐性菌の作成：まず、濃度勾配平板法（渡辺力著「化学療法と耐性菌」1970，朝倉書店発行参照）に従って、耐性菌を作成した。すなわち、各薬剤の10～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を最高濃度とする濃度勾配を有する寒天平板を作り、大腸菌株を画線塗抹した。37℃で数日間培養し、高濃度域に発生した集落を鉤菌して再び同様の平板に接種した。このような操作を数回繰り返して各薬剤に対する耐性株を得た。

（2）薬剤増感効果の測定：耐性株と原株（感受性株）の薬剤感受性を日本化学療法学会標準法〔MIC測定法改定委員会「Chemotherapy」Vol. 2, No. 6, 1126（1974）参照〕により最少発育阻止濃度（以下MICと略記）で比較した。すなわち、薬剤（抗生物質）の初期濃度を200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として、各薬剤の2倍希釈系列を作成し、ハートーインフュージョン（Heart infusion）寒天培地（日本栄養化学株式会社製）と混和したものを平板とした。これにトリプトーソイ（Tryptosoy）ブイヨン中で37℃において18時間培養した各菌株の1白金耳を塗抹し、37℃で18時間培養後、菌株の生育の有無を観察した。

【0018】各耐性株についてポリフェノール化合物と抗生物質（耐性獲得に使用されたもの）の併用によるMIC値の変化をみるためにポリフェノール化合物（培地最終濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を培地に添加し、先の寒天平板法に従い、MIC値を求めた。ポリフェノール化合物の添加によりMICは明らかに低下し、無添加の値の1/2以下にまで低下した。ポリフェノール化合物の添加量は10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。なお、この場合MIC値に影響しないように培養のpH値を7.2±0.1に維持した。また、ポリフェノール化合物自体は本試験に用いた濃度では、試験菌に対して抗菌作用を持たないことは寒天希釈培養法によりあらかじめ確認しておいた。

【0019】本発明による抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤は、前記のポリフェノール化合物又は茶抽出物を、そのまま、或いは好ましくは製剤学的に許容することのできる通常の担体と共に投与することができる。投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、丸剤等の経口剤、注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤などの非経口剤を挙げるこ

とができる。これら経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニト、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸などの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料等を用いて常法に従って製造することができる。例えばカテキン1w/w%と乳糖99w/w%を混合して充填したカプセル剤などである。本発明の抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤は、ポリフェノール化合物を0.01~99重量%、好ましくは0.1~80重量%の量で含有する。また、茶抽出物を有効成分として含む抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤は、その中に含まれるポリフェノール化合物が前記の量範囲になるように適宜調整して、調製することができる。なお、茶抽出物を有効成分として含む抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤を、経口投与用製剤とする場合には、製剤学的に許容することのできる担体を用いて、製剤化することが好ましい。

【0020】本発明の抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤を用いる場合の投与量は、特に制限はないが、茶ポリフェノール量として通常成人1人当たり1mg~10g程度を1日1~4回程度にわけて、経口的に又は非経口的に投与する。本発明で有効成分として用いる茶抽出物は勿論、前記のポリフェノール化合物も、人間の食生

活に古くから定着した茶に由来する成分であるので、安全性の高いことが歴史的経験から既に実証されており、安全性の点において非常に優れたものである。本発明で用いるポリフェノール化合物に毒性は特に認められなかった。

【0021】

【作用】本発明の抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤において有効成分として用いるポリフェノール化合物は、抗生物質耐性の発現を阻害し、抑制するのみならず、一旦、抗生物質に対して耐性となった菌の抗生物質に対する感受性を顕著に向上することができる。従って、本発明の抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤は、抗生物質が本来的に有する抗菌作用を維持あるいは増強することができる。また、前記のポリフェノール化合物は、毒性がない。

【0022】

【実施例】以下、実施例によって本発明ならびにその作用効果を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：抗生物質に対して耐性を獲得した耐性菌の薬剤感受性の増感試験

(1) 耐性菌の作成

大腸菌(E. coli)を用いて前述の濃度勾配平板法により耐性菌を作成し、最少発育阻止濃度(MIC)を測定した。下記表1のような結果を得た。

【0023】

【表1】

抗生物質	最小発育阻止濃度 MIC (μg/ml)	
	原株	耐性株
ペニシリンG	12.5	200 <
ストレプトマイシン	3.1	100
カナマイシン	6.3	200
クロラムフェニコール	1.6	50
テトラサイクリン	3.1	25
セファロリジン	3.1	25
エリスロマイシン	200 <	—

ペニシリンGのMIC値は1667U(単位)=1mgとして換算

【0024】(2) カテキンによる薬剤感受性の増感効果

前記(1)で得られた各耐性菌株についてカテキン

〔(+)—Catechin; フナコシ Code No. 0952: EXTRASYNTHES社製, フランス〕と抗生物質(耐性獲得に使用されたもの)の併用によるMIC値の変化をみるために、カテキンを最終濃

度10μg/mlとなるよう培地に添加し、寒天平板法に従いMIC値を求めた。カテキンを添加しなかった場合(表2の「無添加」と添加した場合(表2の「添加」)の各々の結果を下記表2にまとめて示す。

【0025】

【表2】

耐性株	薬剤 (抗生物質)	MIC (μg/ml)	
		非添加	添加
ストレプトマイシン耐性	ストレプトマイシン	100	25
カナマイシン耐性	カナマイシン	200	50
クロラムフェニコール耐性	クロラムフェニコール	50	12.5

テトラサイクリン耐性	テトサイクリン	25	6.3
セファロリジン耐性	セファロリジン	25	12.5

【0026】 (3) エピカテキンによる薬剤感受性の増感効果

前項(1)で得られた各耐性菌株についてエピカテキン〔(一)－Epicatechin; フナコシ Code No. 0957: EXTRASYNTHESE社製, フランス〕と抗生物質(耐性獲得に使用されたもの)の併用によるMIC値の変化をみるために、エピカ

テキンを最終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるよう培地に添加し、寒天平板法に従いMIC値を求めた。エピカテキンを添加しなかった場合(表3の「無添加」)と添加した場合(表3の「添加」)の各々の結果を下記表3にまとめて示す。

【0027】

【表3】

耐性株	薬剤 (抗生物質)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		非添加	添加
ストレプトマイシン耐性	ストレプトマイシン	100	25
カナマイシン耐性	カナマイシン	200	25
クロラムフェニコール耐性	クロラムフェニコール	50	6.3
テトラサイクリン耐性	テトラサイクリン	25	12.5
セファロリジン耐性	セファロリジン	25	6.3

【0028】

【発明の効果】本発明において有効成分として用いるポリフェノール化合物又は茶抽出物は、抗生物質に対して耐性を獲得した微生物の該抗生物質に対する薬剤感受性を顕著に向上する。また、本発明において有効成分として用いるポリフェノール化合物及び茶抽出物は、古来よ

り飲用されてきた茶の成分であり、茶は入手が容易で実用上も適切な原料である。日常相当量飲用されている天然物を主成分とするので、その安全性は高く、人体に対する副作用の心配はない。従って、本発明は新規で有効な抗生物質耐性微生物の薬剤感受性増感剤を安価に、かつ大量に供給するものである。